

02/369013

PCT/EP 99 / 06898

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

4



E. P 99 / 6898

REC'D 18 NOV 1999	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die CENTEON PHARMA GMBH in Marburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Fibrinklebergergranulat und Verfahren zu dessen Herstellung"

am 23. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol A 61 K 38/36 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. Juli 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 59 611.1

Sieck

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161
06.90
11/98

45 (PCT/91)

CENTEON PHARMA GMBH
ANR 8177007

1998/Z025 – Ma 1183 – C 29
Dr. Lp / vm

Fibrinklebergergranulat und Verfahren zu dessen Herstellung

Gegenstand der Erfindung ist ein rieselfähiges Fibrinklebergergranulat, das alle zur Bildung eines stabilen Fibringels erforderlichen Substanzen enthält und direkt zur Wundverklebung eingesetzt werden kann. Es wird durch die Sprühtrocknung in der Wirbelschicht mittels eines Fluidisationsgases erzeugt.

Es ist bekannt, daß nach der Entstehung einer Wunde die Wundheilung durch eine Aktivierungskaskade mehrerer hintereinandergeschalteter Gerinnungsfaktoren eingeleitet wird. Daraus resultiert am Ende die Reaktion zwischen dem aktivierten Thrombin und Fibrinogen in Gegenwart von Kalziumionen zur Bildung einer Fibrinmatrix, die schließlich die Wunde abdeckt und somit eine Hämostase bewirkt. Diese Fibrinmatrix wird durch den aktivierten Faktor XIII (F XIIIa) über zusätzliche kovalente Bindungen weiter verfestigt, wodurch deren mechanische Stabilität und Resistenz gegen einen vorzeitigen proteolytischen Abbau erhöht wird.

In der modernen Chirurgie gewinnt die Hämostase durch Fibrinklebung zunehmend an Bedeutung, da es sich bei dem sogenannten Fibrinkleber um ein gut verträgliches und die Wundheilung förderndes Biomaterial handelt. Diese Methode eignet sich hervorragend zur Hämostase von stark blutenden Wunden bei Operationen an parenchymatösen, inneren Organen, bei Hauttransplantationen, in der Notfallchirurgie bei

inneren und äußeren Verletzungen, vor allem aber auch zur unterstützenden Abdichtung von Nähten zur Vermeidung postoperativer Blutungen. In der HNO- und Gesichtschirurgie wird für die Heilung äußerer Wunden der Fibrinkleber dem Nahtverschluß aus kosmetischen Gründen vorgezogen. Auch wird der Fibrinkleber zunehmend in der endoskopischen Chirurgie z. B. zur Blutstillung von Magengeschwüren eingesetzt.

Die heute im Handel befindlichen Fibrinkleber wie Beriplast® enthalten neben anorganischen Salzen und Aminosäuren, die aus dem Humanplasma gewonnenen Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Thrombin und Faktor XIII, zusätzlich auch Albumin und Fibronektin zur Förderung der Wundheilung. Obwohl das Präparat sehr gute biochemische und hämostatische Eigenschaften aufweist, bedarf es einer aufwendigen Vorbereitung vor seiner Anwendung. Die voneinander getrennten Fibrinogen- und Thrombinlyophilisate werden separat aufgelöst, in zwei voneinander getrennten Spritzen aufgezogen und in eine spezielle Halterung/Vorrichtung eingespannt. Dieses Verfahren erfordert neben viel Zeit auch gut geschultes Personal. Eine Variante des Fibrinklebers wird als Tissucol® wird bereits in fertig gelöster Form in Spritzen in den Handel gebracht, ist jedoch nur bei tiefen Temperaturen von -20 °C lagerfähig und muß vor der Anwendung im Wasserbad aufgetaut werden. Somit finden beide Varianten des Fibrinklebers keine Anwendung in Situationen, wo ein gebrauchsfertiger und sofort ohne Vorbereitungen einsetzbarer Fibrinkleber von Nöten ist. Außerdem wäre ein gebrauchsfertiger und gut dosierbarer Fibrinkleber auch deshalb kostengünstiger, weil überschüssiges Material weder unnötig vorbereitet noch verworfen zu werden braucht.

Eine mögliche Verbesserung der Handhabung des Fibrinklebers könnte ein Einkomponentenkleber sein, der alle zur Bildung des Fibrins nötigen Komponenten in einem Kompartiment beinhaltet. Die Entwicklung eines Einkomponentenklebers in einer wässrigen Lösung ist allerdings in der Praxis sehr schwer realisierbar. Eine Möglich-

keit besteht allenfalls darin, die Komponenten des Fibrinklebers im getrockneten Zustand zu mischen, womit sich diese nach Applikation auf der Wunde in der Blutflüssigkeit oder dem Wundexsudat lösen und in situ eine Fibrinmatrix ausbilden, die eine Hämostase bewirkt. Dafür ist auch notwendig, das naturgemäß schwer lösliche Fibrinogen in eine derartige trockene Form zu bringen, aus der es rasch in Lösung geht und dabei sofort mit dem Thrombin reagiert.

Es hat auch schon Versuche gegeben, mit einem gezielten Lyophilisationsverfahren Partikel zu entwickeln, die Fibrinogen oder Thrombin enthalten und nach der Herstellung miteinander vermischt auf der Wunde aktiviert werden. So wird in der Internationalen Patentanmeldung WO 97/44015 die Herstellung sogenannter Mikropartikel auf Fibrinogen- oder Thrombinbasis beschrieben, die jeweils einzeln sprühgetrocknet werden. Diese Mikropartikel bestehen zu über 90 % aus Körnchen mit einer Größe bis zum 20 µm. Sie sollen gut löslich sein und können miteinander vermischt zur Wundheilung eingesetzt werden. Ein Nachteil dieser Mikropartikel ist allerdings, daß es sich dabei um ein sehr stark staubendes Pulver handelt, wodurch eine direkte Applikation wie das Aufstreuen auf eine Wunde nicht möglich ist. Ein derartiges Pulver benötigt daher ein spezielles Applikationssystem, was seine Handhabung und klinische Indikationen drastisch einschränkt.

Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein Fibrinklebergergranulat zu entwickeln, das gut löslich, rieselfähig und nicht staubend ist und damit direkt auf die Wunde aufgestreut werden kann z. B. nach dem Prinzip eines Salzstreuers.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein rieselfähiges Fibrinklebergergranulat gelöst, das Thrombin, Faktor XIII, Fibrinogen und ein Kalziumsalz in Granulatkörnchen mit einer Partikelgröße von über 50 bis etwa 1000 µm, vorzugsweise mit einer Partikelgröße von 100 bis 200 µm enthält. Aufgrund dieser Partikelgröße ist das erfindungsgemäße Fibrinklebergergranulat nicht staubend, gut löslich und rieselfähig und

kann hervorragend auf eine Wundfläche oder ein feuchtes Gewebe aufgetragen werden, wo es sofort eine Fibrinmatrix ausbildet.

Einem derartigen Fibrinklebergergranulat können auch noch Albumin, Fibronektin, Aminosäuren und physiologisch verträgliche anorganische Salze zugesetzt werden. Es kann außerdem als ein Freisetzungssystem für biologische, pflanzliche und/oder synthetische Faktoren verwendet werden. Diese Faktoren können die Wundheilung unterstützen oder als Antifibrinolytika, Antibiotika, Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren wirken. Sie werden dem Fibrinklebergergranulat während des Sprühtrocknungsprozesses zugesetzt.

Ein geeignetes Verfahrensprinzip für die Herstellung des erfindungsgemäßen Fibrinklebergergranulats ist bereits aus der Internationalen Patentanmeldung WO 96/15849 bekannt. Dort ist ein Verfahren zur Trocknung von Blutplasma, Blutplasmafraktionen oder daraus gewonnen Blutplasmaprodukten beschrieben, bei dem das Behandlungsgut im flüssigen oder gelösten Zustand in einen evakuierbaren Behälter gesprüht wird, wodurch die Trocknung - bis zur Granulatform - mittels eines Fluidisationsgases in der Wirbelschicht durchgeführt wird. Auf Fibrinogen und Thrombin kann dieses Verfahren jedoch nicht ohne weiteres angewendet werden, da diese Substanzen bekannterweise nach Kontakt mit wässrigen Lösungen zu Fibrin reagieren. Deshalb kommt die Anwendung wässriger Lösungen für die Sprühtrocknung dieser Komponenten nicht in Frage. Um trotzdem beide Komponenten in einem Partikel zu erhalten, werden die Komponenten erfindungsgemäß in einem organischen Lösungsmittel suspendiert und daraus sprühgetrocknet. Fibrinogen, Thrombin und Faktor XIII lassen sich in organischen Lösungsmitteln wie den niederen Alkoholen, Aceton, Nitrilen, flüssigen Kohlenstoffdioxid, Ethern, Chloroform, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid mehr oder weniger homogen suspendieren, ohne daß sie eine Reaktion zu Fibrin zeigen. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels sind sie in wässriger Phase wieder zur Fibrinbildung befähigt.

Erfindungsgemäß erfolgt die Sprühtrocknung dabei entweder durch das Top-Spray-Verfahren, bei dem die Flüssigkeit im Gegenstrom zum Fluidisationsverfahren geführt wird oder im Gleichstrom (Bottom-Spray-Verfahren). Durch das Einsprühen des flüssigen Behandlungsgutes in den evakuierbaren Behälter durch eine geeignete Düse wird eine feine Verteilung erreicht. Das Fluidisationsgas dient dabei sowohl zur Verwirbelung des zu behandelnden Gutes als auch zur Wärmeübertragung. Deshalb wird ein erwärmtes Gas als Fluidisationsgas eingesetzt. Durch die Messung der Produkttemperatur während des Wirbelschichtprozesses und einer darauf basierenden Prozeßsteuerung kann eine produktschonende Trocknung eingehalten werden. Als Fluidisationsgas kann entweder Luft oder ein Inertgas wie Stickstoff eingesetzt werden. Die Trocknung wird dabei so lange fortgeführt, bis das Behandlungsgut in fein verteilter Granulatform und einer Partikelgröße von 50 bis etwa 1000 μm , vorzugsweise von 100 bis 200 μm vorliegt.

Das erfindungsgemäße Fibrinklebergergranulat kann mit oder ohne ein in den evakuierbaren Behälter vorgelegtes Trägermaterial hergestellt werden. Als Trägermaterial kommen dabei vor allem Zucker und Zuckeralkohole wie Sacharose, Lactose oder Mannit in Betracht, die gut bioverträglich sind.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren besteht in einer zweistufigen Sprühtrocknung, bei der zuerst ein Fibrinogengranulat hergestellt wird. Dieses Granulat kann neben Fibrinogen auch andere Proteine, Kohlenhydrate, Aminosäuren und physiologisch verträglich anorganische Salze enthalten. Die Partikelgröße dieses Granulates beträgt mehr als 50 bis etwa 1000 μm , bevorzugt wird jedoch eine Partikelgröße von 70 bis 200 μm . Auf dieses Fibrinogengranulat wird eine feine Thrombin-Suspension in einem organischen Lösungsmittel aufgesprüht, die bereits gelöste Kalziumionen enthält. Die Konzentration der Kalziumionen beträgt 1 bis 100 mM, vorzugsweise 10 bis 50 mM. Man erhält auf diese Weise ein Fibrinklebergergranulat mit einer Partikelgröße, die



vorzugsweise zwischen 100 und 200 μm liegt und eine körnige, sehr gut lösliche Struktur aufweist. Dabei entstehen keine kompakten Partikel wie kleine Kügelchen, sondern ein Granulat mit vielen feinen Kanälen. Dadurch erreicht man eine relativ große Partikelgröße, wodurch das Produkt gleichzeitig staubfrei und gut löslich wird, ähnlich wie der bekannte Instant-Kaffee. Dieses Granulat läßt sich hervorragend auf eine Wundfläche aufstreuen und bildet nach Kontakt mit einem wässrigen Medium sofort ein festes und elastisches Fibringel.

Das erfindungsgemäße Fibrinklebergranulat ist jedoch auch durch Sprühtrocknung von Fibrinogen-Konzentrat aus einer wässrigen Lösung auf eine Vorlage z. B. Mannit, erhältlich. Dabei wird zunächst ein Fibrinogen/Mannit-Granulat erhalten, auf das dann anschließend Thrombin/Kalziumsalz, z. B. aus isopropanolischer Suspension, aufgesprüht wird. Das organische Lösungsmittel verhindert die Bildung von Fibrin nach Kontakt von Fibrinogen mit dem Thrombin.

Schließlich ist es aber auch möglich, separat Fibrinogen- und Thrombin-Granulate mit der vorstehend genannten Partikelgröße in getrennten Verfahren herzustellen, wobei beide Substanzen aus wässrigen Lösungen sprühgetrocknet werden können. Allerdings benötigt man dann bei der Herstellung des Thrombingranulates einen ausreichenden Anteil an Trägermaterial, da im Fibrinkleber die Menge an Thrombin gewichtsmäßig um den Faktor 10^2 bis 10^3 kleiner ist als diejenige von Fibrinogen. Diese beiden Granulate werden miteinander vermischt und können dann entsprechend zur Hämostase und Wundheilung eingesetzt werden.

Die nach den vorstehend genannten Verfahren hergestellten Fibrinklebergranulate wurden anschließend auf ihre biomechanischen Eigenschaften untersucht und dabei die folgenden Ergebnisse erzielt:

Reisskraft nach in vitro Hautklebung (Klebefläche: 2,25 cm^2)

Ergebnis einer Vergleichsstudie anhand einer Randomisierungsliste zu der Reisskraft des einheitlichen Granulates (Thrombin, Fibrinogen und Faktor XIII in einem Partikel), des Granulat-Gemisches (Fibrinogen-Granulat + Thrombin-Granulat) und des flüssigen Fibrinklebers (Beriplast®):

Testsubstanz	Reisskraft
Einheitliches Granulat	3,3 N
Granulat-Gemisch	1,8 N
Beriplast®	1,5 N

Die gemessenen Werte zeigen deutlich den Vorteil des einheitlichen Granulates gegenüber dem Granulatgemisch bezüglich der biomechanischen Eigenschaften. Die Menge an aktiven Komponenten war in allen drei Testsubstanzen annähernd identisch.

Das erfindungsgemäße rieselfähige Fibrinklebergergranulat unterscheidet sich durch eine einfachere Handhabung von den bisher bekannten Fibrinklebern, da keine Vorbereitungsmaßnahmen notwendig sind und es sich stets im gebrauchsfertigen Zustand befindet. Es ist deshalb ganz besonders für die Notfallchirurgie geeignet. Es hat außerdem den Vorteil der außerordentlich einfachen Anwendung durch Auftragen auf die Wundflächen nach der Art eines Salzstreuers. Es eignet sich hervorragend für chirurgische Anwendungen, bei denen eine rasche Hämostase durch Aufsaugen von Blut und gleichzeitige Fibrinklebung erreicht werden sollen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von Fibrinogen-Granulat ohne Vorlage

Eine 10 %ige Proteinlösung von Beriplast®-Fibrinogenkonzentrat (enthält auch F XIII) wurde nach dem Top-Spray-Verfahren in Wirbelschicht sprühgetrocknet. Dieses Verfahren wurde in einer GPCG 1-Anlage der Firma Glatt GmbH durchgeführt und ist in der Internationalen Patentanmeldung WO 96/15849 beansprucht und detailliert beschrieben. Die Bedingungen sind:

Eingangstemperatur:	37 °C
Ausgangstemperatur:	30 °C
Sprühdruck :	3,0 bar
Sprührate :	3,2 g/min

Das derart hergestellte Fibrinogen-Granulat hatte eine mittlere Partikelgröße von 100 µm und war sehr gut löslich. Analytische Aktivitätsmessungen haben gezeigt, daß die Aktivität von Fibrinogen und F XIII durch den Sprühtrocknungsprozeß bei diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt wird.

Beispiel 2

Herstellung von Fibrinogen-Granulaten mit Vorlage

200 g Mannit oder Albumin wurden in die Sprühtrocknungskammer vorgelegt. Auf die Vorlage wurde 100 g Fibrinogenkonzentrat in Wirbelschicht unter folgenden Bedingung aufgesprüht:

M 00 11 99
- 9 -

Eingangstemperatur: 30 °C
Ausgangstemperatur: 24 °C
Sprühdruk : 2,5 bar
Sprührate : 3,0 - 8,0 g/min

Es resultierte ein rieselfähiges und gut lösliches Granulat mit einer mittleren Partikelgröße von 100 µm, bei dem die Fibrinogen- und F XIII-Aktivität voll wiederfindbar ist.

Beispiel 3

Herstellung von Fibrinkleber-Granulat

Auf das in Beispiel 1 oder 2 hergestellte Fibrinogen-Granulat wurde eine isopropanolische Thrombin/CaCl₂-Suspension aufgesprüht. Der Prozeß lief unter folgenden Bedingungen ab:

Eingangstemperatur: 30 °C
Ausgangstemperatur: 25 °C
Sprühdruk : 2,5 bar
Sprührate : 3,0 - 8,0 g/min

Das auf diese Weise hergestellte Fibrinkleber-Granulat mit einer mittleren Partikelgröße von 100 µm war rieselfähig, staubt nicht und bildete sofort nach Kontakt mit einer wässrigen Lösung ein stabiles, d.h. durch F XIII kovalent vernetztes Fibringerinnel.

Beispiel 4

Herstellung von Thrombin-Granulat

Auf eine Vorlage von Mannit oder Humanserumalbumin wurde eine wässrige 0,3 %ige Thrombin-Lösung aufgesprüht. Die Bedingungen waren wie folgt:

Eingangstemperatur:	30 °C
Ausgangstemperatur:	23 °C
Sprühdruk	: 2,5 bar
Sprührate	: 4,2 g/min

Die mittlere Partikelgröße des gebildeten Granulates betrug ca. 65 µm. Es war rieselfähig und nicht staubend. Es ließ sich gut mit dem Fibrinogen-Granulat mischen und war auch als Fibrinkleber einsetzbar.

CENTEON PHARMA GMBH
ANR 8177007

1998/Z025 – Ma 1183 – C 29
Dr. Lp / vm

Patentansprüche

1. Rieselfähiges Fibrinkleber-Granulat, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Granulatkörnchen mit einer Partikelgröße von über 50 bis etwa 1000 µm enthält, die Thrombin, Faktor XIII, Fibrinogen und ein Kalziumsalz enthalten.
2. Fibrinkleber-Granulat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Granulat-Körnchen eine Partikelgröße von 100 bis 200 µm aufweisen.
3. Fibrinkleber-Granulat nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Albumin, Fibronektin und/oder weitere die Wundheilung fördernde Substanzen enthält.
4. Verfahren zur Herstellung des Fibrinkleber-Granulates der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Bestandteile des Fibrinklebers in einem organischen Lösungsmittel suspendiert und in einem evakuierbaren Behälter mittels eines Fluidisationsgases in der Wirbelschicht bis zu einer Partikelgröße von über 50 bis 1000 µm, vorzugsweise 100 bis 200 µm, spühgetrocknet werden, wobei anschließend die Granulatkörnchen gegebenenfalls noch miteinander vermischt werden können.

5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mit oder ohne ein in den Behälter vorgelegtes Trägermaterial hergestellt wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß zunächst ein Fibrinogen-Granulat hergestellt wird, auf welches eine Suspension eines organischen Lösungsmittels enthaltend Thrombin und ein Kalziumsalz aufgesprüht wird.
7. Verfahren zur Herstellung eines Fibrinkleber-Granulates nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die separat hergestellten Fibrinogen- und Thrombin-Granulatkörnchen, die jeweils eine Partikelgröße von über 50 µm bis etwa 1000 µm aufweisen, miteinander vermischt werden.
8. Verwendung eines Fibrinkleber-Granulates nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zur Wundheilung in der Chirurgie, der Gewebstherapie und/oder als Trägermaterial für biologische Faktoren eingesetzt wird.

Zusammenfassung:

Fibrinkleber-Granulat und Verfahren zu dessen Herstellung

Es wird ein rieselfähiges Fibrinklebergranulat beschrieben, das Thrombin, Faktor XIII, Fibrinogen und eine Kalziumsalz in Granulatkörnchen mit einer Partikelgröße von über 50 µm bis 1000 µm enthält. Ein derartiges Granulat wird in einem evakuierbaren Behälter mittels eines Fluidisationsgases in der Wirbelschicht durch Sprühtrocknung hergestellt. Es eignet sich zur Wundheilung in der Chirurgie, der Gewebstherapie und/oder als Trägermaterial für biologische Faktoren.